（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

产品货号：E-BC-K091-S

产品规格：50 assays(48 samples)/ 100 assays(96 samples)

检测仪器：紫外-可见光分光光度计（520 nm）

Elabscience®碱性磷酸酶(ALP)比色法测试盒

Alkaline Phosphatase (ALP) Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

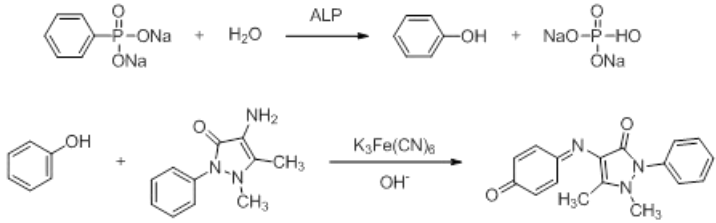
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测动物血清(浆)、体液、组织及细胞中碱性磷酸酶的活力。

检测原理

在 pH=10 的反应液中，碱性磷酸酶催化磷酸苯二钠水解，生成游离酚和磷酸。酚在碱性溶液中与 4-氨基安替吡啉结合，并经铁氰化钾氧化生成红色的醌的衍生物，根据红色的深浅计算酶活的高低。



本试剂盒检测组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法（货号：E-BC-K318-M）。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1) (50 assays)	规格 2 (Size 2) (100 assays)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	30 mL×1 瓶	60 mL×1 瓶	2-8°C 避光保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	基质液 (Substrate Solution)	30 mL×1 瓶	60 mL×1 瓶	2-8°C 避光保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	显色剂 (Chromogenic Agent)	60 mL×2 瓶	60 mL×3 瓶	2-8°C 避光保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	0.5 mg/mL 酚标准储备液 (0.5 mg/mL Phenol Standard)	1.5 mL×1 支	1.5 mL×1 支	2-8°C 避光保存 6 个月

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：紫外-可见光分光光度计（520 nm）、涡旋混匀仪、37℃恒温箱、微量移液器（1000 μL，200 μL，100 μL，10 μL）。

耗材：枪头（1000 μL，200 μL，10 μL ）、EP 管（5 mL，2 mL）、吸水纸、擦镜纸。

试剂：双蒸水、生理盐水（0.9% NaCl）或 PBS（0.01 M，pH 7.4）。

试剂准备

① 试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 0.1 mg/mL酚标准应用液：

按试剂四：双蒸水为1: 4的体积比稀释，现配现用。

样本准备

① 样本处理

血清血浆等液体样本：直接测定。

组织样本：组织处理的匀浆介质为生理盐水（0.9% NaCl）或 PBS（0.01 M，pH 7.4）。匀浆后，4℃，10000 × g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。留取部分上清用于蛋白浓度测定。

细胞样本：取约 10^6 个细胞加入 300-500 μL 生理盐水（0.9% NaCl）或 PBS（0.01 M，pH 7.4）匀浆。匀浆后，4℃，10000 × g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。留取部分上清用于蛋白浓度测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，结合本试剂盒的检测范围（0.2-55.6金式单位/100 mL），选取最佳稀释倍数，进行正式批量实验。不同样本的稀释比例范围如下表（仅供参考）：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
人血清	不稀释	10%小鼠肾匀浆	30-50
人尿液	不稀释	10%小鼠肝匀浆	不稀释
大鼠血清	不稀释	HepG2 细胞	不稀释
细胞上清	不稀释	10%小鼠脑匀浆	不稀释

注：稀释液为 PBS（0.01 M，pH 7.4）或生理盐水（0.9% NaCl）。

实验关键点

操作时，加完试剂二置 37℃孵育 15 min，迅速加入试剂三，避免长时间放置后加样导致结果不准确。

操作步骤

① 空白管：取 50 μL 双蒸水加入到 5 mL EP 管中；
标准管：取 50 μL 0.1 mg/mL 酚标准应用液加入到 5 mL EP 管中；
测定管：取 50 μL 样本加入到 5 mL EP 管中。

② 向步骤①各管中，分别依次加入 500 μL 试剂一、500 μL 试剂二，涡旋混匀。

③ 置 37℃孵育 15 min，迅速加入 1500 μL 试剂三，并立即涡旋混匀。

④ 紫外-可见分光光度计，520 nm 波长，0.5 cm 光径石英比色皿，双蒸水调零，测定各管吸光度。

操作表

	空白管	标准管	测定管
双蒸水（μL）	50	--	--
0.1 mg/mL 酚标准应用液（μL）	--	50	--
样本（μL）	--	--	50
试剂一 （μL）	500	500	500
试剂二 （μL）	500	500	500
充分混匀，置 37℃孵育 15 min			
试剂三（μL）	1500	1500	1500
混匀，520 nm，0.5 cm 光径石英比色皿，双蒸水调零，测其吸光度。			

本试剂盒检测组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法(货号：E-BC-K318-M)。

结果计算

血清（浆）等液体样本中 ALP 活力计算：

定义：100 mL 血清在 37℃与基质作用 15 min 产生 1 mg 酚为 1 个金式单位。

$$\text{ALP 活力（金式单位/100 mL）} = \frac{\Delta A_1}{\Delta A_2} \times m \times \frac{V_1}{V} \times f$$

组织、细胞中 ALP 活力计算：

定义：每克组织或细胞蛋白在 37℃与基质作用 15 min 产生 1 mg 酚为 1 个金式单位。

$$\text{ALP 活力（金式单位/gprot）} = \frac{\Delta A_1}{\Delta A_2} \times m \div (C_{pr} \times V) \times f$$

注解：

ΔA_1：样本 OD 值-空白 OD 值

ΔA_2：标准 OD 值-空白 OD 值

m：标准管含酚量（0.005 mg）

V：加入样本的体积（0.05 mL）

V_1：单位定义中血清体积（100 mL）

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

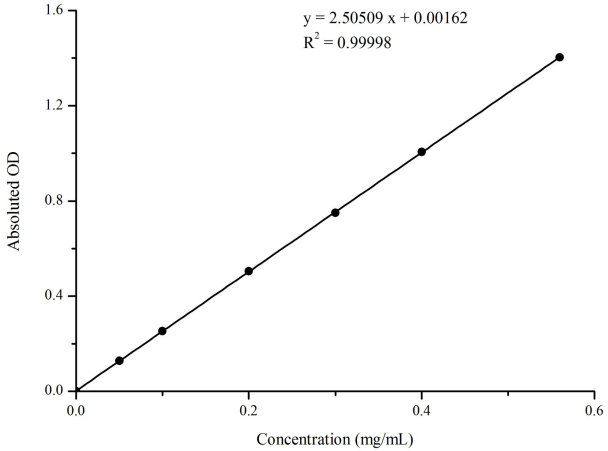
C_{pr}：待测样本的蛋白浓度（g/mL）

附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	0.2-55.6 金式单位/100 mL	**平均批间差**	5.6 %
灵敏度	0.2 金式单位/100 mL	**平均批内差**	2.1 %
平均回收率	99 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)



附录2 实例分析

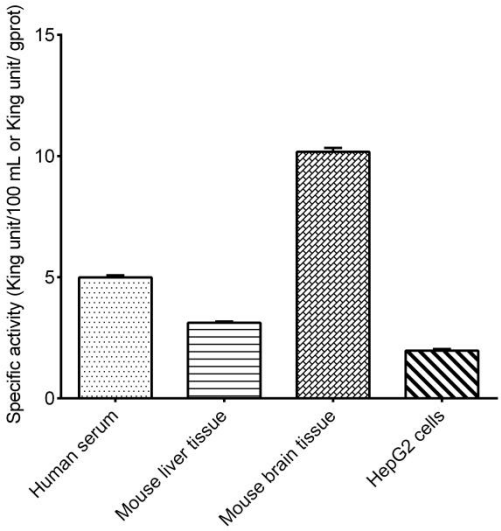
例如检测大鼠血清(数据仅供参考):

取50 μL大鼠血清，按说明书中操作表操作，结果如下：

空白管OD值为0.020，测定管OD值为0.345，标准管OD值为0.270，带入公式计算得：

$$\text{ALP 活力（金氏单位/100 mL）}=\frac{0.345-0.020}{0.270-0.020}\times 0.005\times\frac{100}{0.05}=13.01\ \text{金氏单位/100 mL}$$

按照说明书操作，测定人血清（加样量50 μL）、小鼠肝脏组织（10%组织匀浆的蛋白含量0.013 g/mL，加样量50 μL）、小鼠脑组织（10%组织匀浆的蛋白含量0.004 g/mL，加样量50 μL）及HepG2细胞（蛋白含量0.003 g/mL，加样量50 μL）中碱性磷酸酶的活力（如下图）：



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
复孔差异大	37℃孵育后没有迅速加入试剂三	37℃孵育后应迅速加入试剂三
	加试剂三后没有充分混匀	加完试剂三，充分混匀
样本和标准品显色很低	孵育时间太短	保证充足的孵育时间
样本测不出值	样本稀释倍数太大	升高样本检测液制备过程中的组织浓度，重新检测
	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本，重新检测
样本测量结果>55.6金式单位/100 mL	样本浓度太高	选择合适稀释倍数，重新检测
读数数值低	用不恰当波长检测	选择正确的检测波长

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

附录4 客户发表文献

1. Liu C , Zhang Z , Li B ,et al.Lipid Metabolic Disorders Induced by Organophosphate Esters in Silver Carp from the Middle Reaches of the Yangtze River[J].Environmental Science & Technology: ES&T, 2024(11):58.DOI:10.1021/acs.est.3c08610.

2. Bhowmik A D , Das T , Chattopadhyay A .Chronic exposure to environmentally relevant concentration of fluoride impairs osteoblast's collagen synthesis and matrix mineralization: Involvement of epigenetic regulation in skeletal fluorosis[J].Environmental Research, 2023, 236(Part2):11.DOI:10.1016/j.envres.2023.116845.

3. Ma X, Zhang W, Chen Y, et al. Paeoniflorin inhibited GSDMD to alleviate ANIT-induced cholestasis via pyroptosis signaling pathway[J]. Phytomedicine, 2024, 134: 156021.

4. Sheng Y, Zhou J, Zhang P, et al. Effect of chiral polymers on Muse cell proliferation and differentiation[J]. Materials Today Chemistry, 2024, 42: 102425.

5. Xue X, Zhao X, Wang J, et al. Carthami flos extract against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis via alleviating angiogenesis in mice[J]. Phytomedicine, 2023, 108: 154517.